

⑩ 日本国特許庁 (JP)
⑪ 特許出願公表
⑫ 公表特許公報 (A)

昭63-503242

⑬ Int. Cl. 4
G 01 N 33/58
C 12 Q 1/68
1/70
G 04 D 7/00
G 09 F 3/03

識別記号

府内整理番号
A-8305-2G
A-6807-4B
6807-4B
6781-2F
D-6810-5C

⑬公表 昭和63年(1988)11月24日
審査請求 未請求
予備審査請求 未請求 部門(区分) 6 (1)

(全 11 頁)

⑭発明の名称 真偽を立証したい物品の標識

⑬特 願 昭62-502252
⑭出 願 昭62(1987)4月9日

⑬翻訳文提出日 昭62(1987)12月9日

⑬国際出願 PCT/GB87/00242

⑬国際公開番号 WO87/06383

⑬国際公開日 昭62(1987)10月22日

優先権主張 ⑬1986年4月9日 ⑬イギリス(GB) ⑬8608629
 ⑭発明者 リ・ページ, リチャード・ウイ イギリス国、ケンブリッジ・シー・ビー・2・1・ティ・エイ、ゴ
ンビル・アンド・カイウス・カレッジ(番地なし)
 ⑭発明者 スレイター, ジエイムズ・ハウ イギリス国、カーディフ・シー・エフ・4・5・エス・アール、リ
ード
 ⑭出願人 バイオタル・リミテッド ズペイン、ホウル・ワイ・ディリン・38
 ⑭代理人 弁理士 川口 義雄 外2名 イギリス国、カーディフ・シー・エフ・4・5・デイー・エル、チ
 ⑭指定国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB, GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許), US

請求の範囲

- 真偽を立証したい品物または物質の標識方法であって、所定の巨大分子の第一化合物(シグナル化合物)を用いてこの第一化合物の正体を明らかにすることなく品物または物質を標識し、この第一の化合物には相補的な第二の化合物が結合し得、その結果第一の化合物の存在を明らかにし、したがって品物または物質が本物であることを立証できるようになっていることを特徴とする方法。
- シグナル化合物を直接品物もしくは物質中に組み込むか、シグナル化合物を品物もしくは物質に付着せしめるか、シグナル化合物を含んでいる材料を品物もしくは物質に塗布適用するか、またはシグナル化合物を品物もしくは物質の内部物中に含ませることによって、標識を達成する、請求の範囲1に記載の方法。
- シグナル化合物が付着しているタグを用いて品物を標識する、請求の範囲1に記載の方法。
- タグを、直接品物に取り付けるか、品物の構造の一部として品物中に直接組み込むか、またはその他のやり方で品物に結合する、請求の範囲3に記載の方法。

- 巨大分子の形態にあるシグナル化合物を用いて品物または物質を標識する、請求の範囲1に記載の方法。
- 細菌もしくはカビ類の孢子の形態またはウィルスの形態にあるシグナル化合物を用いて品物または物質を標識する、請求の範囲1に記載の方法。
- シグナル化合物が核酸である、請求の範囲1に記載の方法。
- 核酸がDNAである、請求の範囲7に記載の方法。
- DNAが、特異的DNAプローブとハイブリダイズし得る1個以上のシグナル配列を含んでいる、請求の範囲8に記載の方法。
- 前記DNAを他のDNAと混合する、請求の範囲8に記載の方法。
- DNAが、微生物のゲノムDNAまたは前記エンドヌクレアーゼによるその部分消化物に由来するDNAである、請求の範囲8に記載の方法。
- DNAがプラスミドの形態にある、請求の範囲8に記載の方法。
- DNAが合成DNAである、請求の範囲8に記載の方法。
- 各々が別々の領域を占めている一連の異なるシグナル化

特表昭63-503242 (2)

合物を導導する、請求の範囲1に記載の方法。

15. 一連の別々の領域の同一のシグナル化合物を導導する、請求の範囲1に記載の方法。

16. 貨物品、医薬品およびその他の化学薬品、フィルムおよびレコード、銀行券、美術工芸品、証書類ならびに機会および部品から選択された品物または物質を標識する、請求の範囲1に記載の方法。

17. その貨物品または物質がシグナル化合物で標識されているかどうかを、第一の化合物の存否を明らかにできるように相補的な第二の化合物を用いて決定し、その結果品物または物質が本物であることを確かめることをさらに含んでいる、請求の範囲1に記載の方法。

18. 品物または物質の真偽を決定するための方法であって、
(i) 品物または物質が所定の巨大分子の第一化合物（「シグナル化合物」）によって標識されているかどうかを、第一の化合物の存否を明らかにできるようにこの第一の化合物に結合することができる相補的な第二の化合物を用いて決定し、その結果、
(ii) 品物または物質が本物であることを決定することを特徴とする方法。

明細書

真偽を立証したい物品の標識

本発明は物品の真偽を立証する(*to authenticate*)ための物品の標識(ラベル付け)に係る。

現代の世界は多くの領域で真偽の立証に関する重要な問題に直面している。製造業界でみられるような大量生産された製造品にしても、若者的世界でみられるような原作にしても、これらは混亂を引きこし、かつ真の創作者にとっては収益の損失を招く。産業の発達した国々の内での世界貿易に関しては原物製造者の行為によって何兆ものドルが失われると推定されている。時計、電気製品、ハイファッショング衣類などのような一派で価値の高い物品の製造業者にとっては事は特に盛大である。生産国または外因での製造品の販売は産業界にとって商取引上の主要な競争である。明らかに、質の高い低価格の製品もまた模倣と許諾的販売の対象になる。

さらに、個人、法人、公共団体および政府が模倣の抑制以外の理由で本物の品物を標識したいと思うのには多くの理由がある。たとえば、ある物品または品物(アイテム)の最終的な選

命の陳述を可能にするように製造・販売網(ネットワーク)に沿った本物の品物の流れを追跡記録(モニター)するためである。これによってある特定の製造ネットワークの色と比べた频率に関する情報が得られるであろう。そしてこの場合明らかに模倣に対して対処する必要はほとんどない。しかしこの原理は、品物を一筋的に、そして模倣された品物の明白な同定を可能にするシステムによって標識する場合もやはり同じである。

それ自体模倣されることなく、したがって模倣された品の最初を保護するのに利用されることのない完全に安全な保護システムを得るためにいろいろな作動モードに適用することができるシステムに対するニーズがある。そのようなシステムを適当な操作条件下で用いると本物の品物の取引と販売をモニター・制御・調節することができ、しかも製造業者と消費者の双方をある程度保護することになる。次の3つの主要な保護機能を達成するように設計された完全に安全なシステムに対するニーズがある。

(a) ある品物のコピー(複製)品を製造・販売する権利をもたないコピー業者による、コピーされた偽の品物の許諾的販売から真の製造業者を保護すること。

(b) コピーされた偽の品物の故意または偶然の販売からそ

特表昭63-503242(3)

れに気付かない消費者を保護すること。

(c) 政府および全ての適当な政府機関が、個別にしろ大臣生産にしろ模倣された偽物品の商取引を適宜追跡・調査・取締り・かつ訴追する際に役に立つこと。

このたび、物品の真偽を立証する困難に対する新しいアプローチが開発された。本発明においては2つの重要な事実を考慮する。まず第一に、簡単な化学分析手段によってDNAまたはタンパク質自身のような分子の、存在または不存在を検出する能力を利用する。このような手段は、DNA(または別の巨大分子)が存在するか否かを示すプラス/マイナス試験である。異なる結果、すなわち異なる生体に由来するいろいろなDNA分子間に区別はない。しかし、このシステムの分解能は2番目の事実、すなわち核酸やタンパク質のような化合物の全配列または置換部分がもっている、一義的に標識され、したがってある物品が本物であることを明らかにする能力を利用することによってかなり改善することができる。

したがって本発明は真偽を立証したい物品または物質を標識する方法を提供する。この方法は物品または物質を所定の巨大分子からなる第一の化合物によって標識することからなるがこの際この第一の化合物の同一性(種類)を標示(公表)すること

が可能になったのである。本発明はタグ(目印)による本物の物品の認可された標識に依存する。このタグは、たとえば、このタグ(したがってこのタグが付けられている物品または物質)の真偽がこのタグの創作者(生産者、デザイナー)によってのみ決定できるような量、形態およびタイプで1種類以上のシグナル化合物を担持している。

あらゆる物質または物品(物品)を標識することができる。本発明の技術は時計、香水および衣服のような豪華品、医薬ならびにその他の肥料、除草剤および殺虫剤のような化学品、フィルムおよびレコード、銀行券、美術工芸品、パスポートのような証明書、さらに自動車部品のような機械・部品などを適用しうる。

標識はさまざまな方法で実施することができる。たとえば物品または物質の製造中にその中へ直接シグナル化合物を入れてもよい。あるいは、接着剤などによってシグナル化合物を接着させててもよい。この接着剤がシグナル化合物からなっていてもよい。またシグナル化合物は、物品または物質に塗布される塗料またはインクのような材料中に含まれてもよい。物品または物質の内包物がシグナル化合物を含んでいてもよい。

シグナル化合物が付いているタグを用いて物品を標識しても

とはしない。この第一の化合物には相補的な第二の化合物が結合することができて、その結果第一の化合物の存在を明らかにでき、したがって品物または物質が本物であることを立証できる。

本発明はまた、品物または物質の真偽を立証・確認するための方法も提供する。この方法は、

- I) 所定の巨大分子からなる第一の化合物の存在または不存在が具現化され得るように第一の化合物に結合することができる相補的な第二の化合物を用いて、品物または物質が前記第一の化合物によって標識されているか否かを決定し、それにより、
- II) 品物または物質の本物であることを決定することからなる。

便宜上ここでは第一の化合物をシグナル化合物と称する。このシグナル化合物は、たとえば核酸の場合には塗装の、タンパク質の場合にはアミノ酸の配列からなり得、この配列には相補的な第二の化合物が結合する。ここではこの配列をシグナル配列と称する。

したがって、今や、各々が本物として一義的にしかも所定の程度の標識性をもって標識され得るように厳格な保護が施される品物もしくは物品群もしくは物質群を標識すること

が可能になったのである。本発明はタグ(目印)による本物の物品の認可された標識に依存する。このタグは、たとえば、このタグ(したがってこのタグが付けられている品物または物質)の真偽がこのタグの創作者(生産者、デザイナー)によってのみ決定できるような量、形態およびタイプで1種類以上のシグナル化合物を担持している。

シグナル化合物は、このシグナル化合物の存在の検出を可能にするように相補的な第二の化合物が結合することができる化合物である。シグナル化合物は核酸やタンパク質のような巨大分子である。そのような巨大分子の塗装のシグナル化合物、すなわち他の巨大分子を用いて品物または物質を標識してもよい。この巨大分子は合成品でもよいし、天然源から得られたものでもよい。したがってDNAの場合、クノムDNAまたはその制限エンドヌクレアーゼによる部分消化によって得られるDNAを使用することができる。

しかしながら別方法として、標識としての使用条件に耐え得る酵素またはその他の生体の耐久性の形態にあるシグナル化合物を用いて品物または物質を標識してもよい。DNAおよび

特許63-503242(4)

(ある種のウィルスの場合) RNAでは、シグナル化合物は生体のゲノム全体またはその一部でよい。したがって、特にウイルス、細菌およびカビのような微生物を標識として使用することができよう。これらは少量で、しかし固定可能な量で使用し得る。菌の例は、*B. subtilis*、*B. cereus*もしくは*B. megaterium*のような*Bacillus*の種または*Penicillium*もしくは*Aspergillus*のようなカビの種の菌である。これらの場合DNAやRNAは再構成することができる生体系の中に含有され、そのDNAかRNAを固定することになるであろう。菌DNAたとえばサケ菌DNA (Sigma B-1501) もシグナル化合物として使用できる。

各々が別々の標準を占める一連のいろいろなシグナル化合物を提供し得る。あるいは、別々の領域の一連の同じシグナル化合物を提供してもよい。この場合、いろいろな第二の粗補助化合物を使用して各領域のシグナル化合物内のいろいろなシグナル配列と結合させることができる。これは特にシグナル化合物が複数である場合に適用される。シグナル化合物は核酸、DNAまたはRNAが好みしい。

簡単にいえば標識の目的には單に巨大分子の存在または不存在を検出するだけで十分であろう。すなわち、ある種の目的に

生することによって異なる種のDNAおよび同じ種の異なる株のDNAを認識することが可能である。当該生体のゲノムDNAからランダムに得られたDNAの断片からなる特別に標識されたプローブを使用することができる。合成DNAプローブを使用してもよく、同様にH-13アローフ標識体のようなバクテリオファーダプローブも使用し得る。また、プラスミドプローブを使用することができる。このプローブDNAは異なるDNA分子内に含有されているかもしれない混合DNA配列とハイブリダイズすることができる。

したがって本発明においては、品物または物質がシグナルDNAで標識され得る。このシグナルDNAは特定のプローブDNAとハイブリダイズすることができる配列を含んでいる。この配列がシグナル配列である。シグナルDNAとプローブDNAとの双方が密にされている。標識されている品物または物質をプローブDNAを用いて分析した結果シグナルDNAのシグナル配列が示された場合、この品物または物質は本物である。そうでなければその品物または物質は本物ではない。このプローブDNAはもちろん、ハイブリダイゼーションが生じたかどうかを異常化するように、たとえば放射能もしくは酵素ラベルによって、ビオチニル化(biotinylation)によって、または光

は、該の分子としての、または生体系の一部としてのDNAの存在を決定すれば十分であろう。DNAの存在を検出するには、エチシウムプロミド、アクリシンオレンジまたはビス-ベンズイミド(H33258, Hoechst dye 33258)のような非特異的にDNAに結合する化学薬品を使用することができる。エチシウムプロミドの場合この化合物は普通の可視光の波長では検出できない。したがって標識はDNAとエチシウムプロミドとを共に提供することによって達成し得る。これらの存在はその後紫外線によって検出することができる。これによって簡単な標識方法が得られるが、高い程度の致死性は得られず、したがって高い安全性も得られない。それはプラス/マイナス試験である。

各種、さらに種内の各株に対するDNAの独自性と、独特のDNA分子を迅速、一義的かつ正確に認識することに供する技術的水準とが相俟って、有生物と無生物とのあらゆる起源であらゆる種類の物品を、標識された物品が同定し得るように標識することの基盤となる。これによって、簡単なプラス/マイナス試験よりも洗練された形の標識が可能になる。

生体の各株についてDNAまたはRNAの分子は独特である。同じ種の異なる株は標識の配列における小さな変化によって異なる。たとえば、標識したDNAプローブでDNAを検

ビオチニル化(biotinylation)によって標識されている。

シグナルDNAは1種以上の異なるシグナル配列を含んでいてよい。すなわち、同一のタグに対して所与のDNAシグナル分子を別個に数回使用して個々の特定DNAプローブのいずれを使用したかに応じた該特のシグナルを得ることができる。シグナル配列が反復して存在しているのが好みしい。これによってプローブDNAに対するシグナル配列の濃度が向上する。シグナルDNAは微生物のゲノムDNAであるのが好みしいが、簡単な系では、合成して得られるような短いDNA配列を使用することもできる。ウィルスまたは最近のゲノムDNAを使用してもよく、同様にゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼで部分消化したものも使用できる。プラスミドも使用できる。

シグナルDNAのシグナル配列は、これとハイブリダイズすることができるプローブの入手容易性によってあらかじめ定められた配列とすることができる。それはDNA分子に固有の配列でもよい。あるいはまた、DNA分子の中に特別に導入してもよいし、DNA分子と組合してもよい。シグナル配列のサイズはプローブDNAに対する検出可能な応答が引き出されるようなものとすべきである。取扱上の理由から 1~10 kbp のシグナル配列が適切である。

シグナルDNAで標識された品物または物質が本物であるという確信がさまざまな程度で得られる。標識の程度はシグナルDNAを2種以上用いることによって向上することができる。品物または物質は、別々の領域が各々異なるシグナルDNAによって標識されていてもよい。シグナルDNAは別のDNAと混合して適用してもよい。これをここでは迷路DNAと呼ぶ。この迷路DNAが存在すると、シグナルDNAの正確なシグナル配列を決定しようとしている人の仕事が複雑になる。

本発明は以下のようにして適用され得る。一連の異なる微生物を個別に増殖させる。各々の微生物に対してゲノムDNAを抽出し、標準的な分子生物学の技術を用い、特定の制限エンドヌクレアーゼで消化して生成したゲノムDNAの短い配列をランダムにクローニングすることによって一組のいろいろなプローブを製造する。これによって、当該DNAを得ることができ各微生物種のDNAをハイブリダイゼーションによって識別するプローブが生成する。したがってプローブDNAは、原則的にシグナルDNAのみが所有しているはずのシグナル配列を定める。

一般的なプローブが異なる種のDNAとハイブリダイズすることはありそうもないが、これは異なる起源のDNAに対して

そのプローブをハイブリダイズさせようとして見れば容易にチェックすることができる。クロスハイブリダイズするプローブはすべて識別することができる。類似の手段を使用して、同じ種の異なる株から得たDNAに対するハイブリダイゼーションを調べることによって株に特異的なプローブを得ることができる。クロスハイブリダイズしないものは所々の種のある特定の株に対して特異的である。組にしたプローブを標識し、その後の使用に備えて貯蔵する。

タグを作るには、紙、接着したセルロースもしくはセルロースアセテートのシート、またはHybond CもしくはHybond N (Amersham International plc) などのようなナイロンベースの膜などといった適当な支持材料上の決められた位置にシグナルDNAを配列すればよい。シグナルDNAは、微生物の胞膜から分離してまたは処理液み細胞液液もしくはペーストの形態で適用できる。このDNAはドット(点)またはバンド(帶)のいずれで適用することもできる。各々のドットまたはバンドは異なる微生物から得たDNAであるか、または異なるシグナルDNAを含有している。DNAは、プローブDNAとハイブリダイズすることができる形態で支持材料に結合する。すなわち、DNAは通常疎結合しておくかまたは一本鎖にしておく。興

要的な場合、各々別個の領域に適用されるシグナルDNAの量は10³~10⁴である。シグナルRNAをDNAの代わりに用いてもよい。細胞やカビの胞子を直接使用してもよく、同様にウイルス粒子も使用できる。

こうして作成したタグを、真偽を立証したい品物または物質に結合する。そのようなタグによって標識されたなんらかの品物または物質の真偽を決定するには、防腐しておいた標識したプローブDNAを用いてタグを処理・加工する。プローブDNAをタグに接触させ、各シグナルDNAのシグナル配列に結合させる。プリセットパターンに従ってハイブリダイゼーションを測定して、標識された品物または物質が本物であることを確認する。

このようにして品物または物質が本物であるという非常に高度の信頼が達成できる。たとえば、タグがそれぞれ3つのドットのDNA 6列からなり、各DNAが異なっており、このタグを作るのに少なくとも1000個の独特なシグナル配列を与えるDNAの異なる1000個の起源が使用できると仮定しよう。1000個の別々の異なるDNAのアールからランダムに抜き出した3つのドットのいずれかの所々の列を偽造者が独立に再生できる確率は、パターンを作るのに1000個のDNAを使用したことを偽

造者が知っている場合で10³に1である。いかなる偽造者でも、その人が生命体のずっと大きいサンプルから得たDNAに対する診断用DNAプローブの完全な一組をもっていない限り、いかなる方法によってもこのことを図り始めることさえできないのであるから、この技術の基礎を形成するのにどの1000個のDNAを選択したかを偽造者が知ってしまうという「最悪のケース」の例でも起こらない限り、偽造者がこのパターンを再生できる確率を計算する直前の道はない。この場合ドット16個の完全なタグについて偽造者が正確な列を再生する確率は10¹⁶に1である。明らかに、いかなる信頼性限界も、タグのマークーに利用できるシグナルDNAの数およびタグに適用するシグナルDNAの数に応じて選択することができる。

これらの考察は、本発明を適用し得るさらに進んだレベルにもあてはまる。これは、DNA制限酵素の多型性に基づく生体の同一性における微小な差の検査に依存する。これをいかに行なうかは我々のWO-A-86/02101に開示されている。これによつて、いずれかの同一性(相違)は知られている第一と第二の生体が同一であるかどうかを決定するための方法が得られる。この方法は、

(1) 第一の生体のゲノムDNAを1種以上の制限エンドヌクレアーゼで消化し、

(II) こうして得られたDNA断片を電気泳動によって分離し、(III) こうして分離した断片の、1種以上の第一の標識プローブとハイブリダイスする断片の位置を決定し（「ハイブリダイゼーションパターン」、「バンドパターン」または「マップ」）【このプローブまたは各々のプローブは第一または第二の生体と同じ種の生体のゲノムDNAからランダムに選択されたDNAの断片を含む】、

(IV) こうして決定された断片の位置を、前記第一のプローブまたはその各々に結合するDNA断片（これは第一の生体のゲノムDNAから得られたDNA断片と同じ方法によって第二の生体のゲノムDNAを前記の制限エンドヌクレアーゼまたはその各々で消化して第二の生体のゲノムDNAから生成しつつ電気泳動にかけておいたものである）の位置と比較することからなり、

ここで、ステップ(I)から(IV)は、ステップ(IV)での比較によってふたつの生体が同一でありそうであることが明らかにされた場合、このふたつの生体が真に異なる無関係のものとして区別され得ないという確率(X)、すなわち

X = F⁴ ①

【ただし、①はステップ(III)におけるプローブ検査によって

明らかにされた位置の数であり、Fは、第一と第二の生体と同じ種から独立に得られた生体の対のゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼ消化したものの間における、同一であるDNA断片の割合を表す率である】によって決定される確率(X)が 10^{-12} 以下となるように、ステップ(III)におけるハイブリダイゼーションによって充分なバンドが表現されるような量のプローブDNAと1種以上の制限エンドヌクレアーゼを使用し、(a) 前記第一と第二の生体と同じ種を代表するF値を得るために充分な数の、前記種から独立に得た生体のゲノムDNAを、同じ制限エンドヌクレアーゼを使用して別々に消化し、結合によっては各々の消化物を別々の部分に分割し、(b) 独立に得た生体の各々に対して消化物または消化物の一部を、平行してゲル電気泳動にかけ、(c) 前記種の生体のゲノムDNAからランダムに得られたDNAの断片からなる第二の標識プローブを用いてゲルをプローブ検査し、(d) こうして表現されたゲル上のハイブリダイゼーションパターンを、独立に得た生体の対結合(pairwise combinations)に対して比較し、さらに(e) 異常によっては、独立に得た生体の各々に対する消化物の

1つ以上の別の部分についてステップ(a)から(d)を繰返す（ただし、各自異なる前記のDNA断片からなる前記第二の標識プローブを用いる）

ことによって実施する。

換言すると、①は、2つの生体が同一のマップをもっている場合、ステップ(IV)における第一と第二の生体の対結合によって明らかにされたDNA消化断片の共通の位置の合計数である。

ステップ(I)から(IV)は、

(I') 第一の生体のゲノムDNAと第二の生体のゲノムDNAと同じ制限エンドヌクレアーゼによって別々に消化し、結合によっては各消化物をいくつかの部分に分割し、

(II') 各生体について消化物または消化物の一部を平行してゲル電気泳動にかけ、

(III') 前記第一の標識されたプローブを用いてゲルをプローブ検査し、こうして表現された2つの生体のハイブリダイゼーションパターンを比較し、

(IV') 異常によって、各生体の消化物の1種以上の別の部分について、ただし各回各異なる前記のDNA断片からなる前記第一の標識されたプローブを用いてステップ(I')と(III')を

繰返す

ことによって実施するのが好ましい。

ステップ(I')から(IV')の手順は、各回各異なる制限エンドヌクレアーゼを用いて二回以上実施することができる。

WO-A-86/02101 の方法は、2つの生体に対するハイブリダイゼーションパターンの間にある差を検出できないことがどの程度同一性の証明と考えられるかの程度に依存する。その方法を本発明に適用して、シグナルDNA（第一の生体）は、典型的な場合25~250kの量でタグに適用（塗布）する。このタグを、真偽を立証したい品物または物質に付着（結合）させる。品物の真偽を決定するには、たとえば電気泳動によってシグナルDNAをタグから除去し、すでに検査しておいた本物のシグナルDNA（第二の生体）と比較する。シグナルDNAのシグナル配列は、WO-A-86/02101 に従ってハイブリダイゼーションパターンを決定する際に使用するプローブとハイブリダイスする配列である。シグナル配列はあらかじめ決定し得る。プローブは先に検査して貯蔵しておくことができる。あるいはまたプローブは、ラベルから選定されるシグナルDNAを本物のシグナルDNAと比較する時点で製造することもできる。

WO-A-86/02101 の方法を利用することによって、あるシグナ

特表昭63-503242(7)

ルDNAが所有の種の特定の株に由来するものであることを所定の複数回まで解析することができる。このように、追加される各DNAについてそれが特定の株に由来するという信頼度を得ることができる。たとえば、 3×10^{62} に1回の信頼度で誤って同一であるとされるような場合、該のタグの製造者が2つの正確なシグナルDNAを用いてタグを作成するチャンスは 9×10^{124} である。

また別の場合にはシグナル化合物がタクパク質であってもよい。ここで本発明はいろいろなタンパク質のアミノ酸配列の変化とそのような配列を認識する能力とによっている。たとえば抗体-抗原システムを使用してもよい。シグナル化合物が抗原として機能する場合、シグナル配列は抗体によって認識される抗原決定基である。シグナル化合物が抗体として機能する場合、シグナル配列はこの抗体の中で対応する抗原に結合する際に媒介となる配列である。抗原分子と抗体分子の双方がイムノグロブリンであるイディオタイプ-抗-イディオタイプシステムを使用してもよい。一方のイムノグロブリンが他方の抗原結合部位に対する結合特異性を有している。

抗体-抗原システムは以下のようにして用いることができる。一連の異なるハプテンのような、交差反応しない各種の異なる

シグナル化合物で、たとえばタグの形態で保護されていることを宣言することができる。このタグは、取外しのできる自立ラベルを形成していてもよい。ただしこのラベル上には、なんらかの所要の印刷した情報、とくに製造業者の個々の独特のタグに対するバッチコード番号が出現するようになっている。製品を購入した消費者はこのタグを調査分析させるために寄送することができる。したがって偽って印刷されたタグは容易に同定することができる。

後者の場合製造業者はタグの存在を公表することなく秘密裡にそのタグを自分の製品に付ければよい。製造業者の代理人が通常の消費者を経て小売店から製品をサンプリングすることによって、このタグの製造者は該製品が製造の製品が出来ているか否かを観察することができる。

どちらの道を採用したとしても個々のタグはユニークであるが、かついろいろなシグナル化合物を有し得る。あるいは、同じシグナル化合物をもつた1群のタグを使用してもよい。シグナルDNAを使用する場合、すでに記載したどちらのレベルでも作動するようにタグを設計することができる。

以下の実験例で本発明を示す。

抗原で動物群を免疫して抗体を製造する。その動物から血清を收集し、個々の抗原に対して生じた抗体を精製する。次にこの抗体を、硝酸セルロースまたはナイロンベースの基材たとえばHybond GやHybond Nのような適切な基材上に固定化する。抗体を付けたパターン化された一連のポイントを並みどおりに作り上げる。次いでこの結合用の膜の非特異的結合特性をブロックする。この膜を乾燥し、プラスチックの下に密封し、真偽を立証したい偽物または物質につなぐ。解説するには、特異的な抗原またはハプテンをタグに塗布する。適当な検出系を用いて結合を検出する。

本発明によって提供される安全性は、シグナル化合物が秘密に保たれる特定の暗号系に依存する。あらかじめ決定した所定のシグナル化合物を標識に使用するが、その同一性（種類）は公表しない。どのシグナル化合物が使用されているかが内田の検査では明らかにならないようにして偽物と本物を標識する。しかし、製造業者は、偽物が容易に同定されるように自分の製品を安全に標識したいならば、それが本発明に従って標識されていることを公表するあるいはこの事実を隠さないで目的を達成することができる。

前者の場合、製造業者は広告によって、本物の製品がすべて

実験例 1: *Lactobacillus plantarum* BT161 (KC18 12156) の DNAに対するプラス/マイナス試験

Lactobacillus plantarum BT161 は NO-A-88/02101 に記載されている。これは、1985年 9月 25日、the National Collection of Industrial (現在は and Marine) Bacteria, Aberdeen, (英國) に受託番号 KC18 12156として受託されている。NO-A-88/02101 に記載されているようにして BT161 からゲノムDNAを得た。このゲノムDNAを 100°で 5 分間加熱して変性した。

Hybond C または N のタグの材料上に DNA を付着させるためにこのタグの反対側から変性DNAの溶液の試料を塗布した。タグは次いで 37°C で 30 分間乾燥した。次に、50°C で 4 時間までペーリングすることにより、またはタグを 30 分間紫外光 (304nm) に露出することにより、変性DNAをタグに共有結合させた。いくつかのタグは、可溶性で透明な PVC (ICI plc) かサランラップ (Dow Corning) で被うことにより保護した。また、硝酸物とナイロン繊物 (シャツ) も変性DNAで標識した。各繊物に変性DNAの溶液を 100μlずつ加えた後空気中で乾燥した。5mg から 5mg の量のDNAをタグと繊物に塗布した。

その後、プラスチックフィルムが付いていたタグからそのフィルムを除去した。5mg/は米国エチカルムプロマイドの溶

特表昭63-503242(8)

液でこのタグを染色した。紫外線を照射(304nm)すると赤褐色のケイ光が発現された。これは、エチグムアロマイトがDNAへ結合したことを意味している。類似のやり方でシャツの綿織物とナイロン織物のDNAが分布されている領域をエチグムプロマイト溶液で染色した。やはりケイ光が発現され、DNAの存在が明らかになった。

実施例 2：固有で单一または低いコピー数のシグナル配列を用いたタグの製造

1. シグナルDNAおよびプローブDNAの用意

1.1. 微生物のDNA種を選択する。

1.2. 簡単的な手法によってゲノムDNAを調製・精製して純粋な高分子量のDNAを得る。

1.3. DNAを制限酵素(たとえば Sau3A)で消化してプローブ用の特異的配列を選択し、1%アガロースグル電気泳動によりDNAをサイズ分離し、これから、便利なサイズの断片を電気溶出し [McDonnel K.W. ら (1977) *J. Molec. Biol.*, 110, 119参照]、溶したプラスミドベクター中へクローン化することができる。これらのクローンは次に、Kafatos C. ら (1979) *Nucleic Acids Research*, 7, 1541の急速な「ドットプロット」法のようなテストを用いて他のDNA種との相容性を

2.2. この膜を乾燥し、密封する。

3. タグの用意

3.1. 周囲にしている表面に対して調製したタグの本質的な特徴を記録するデータバンクを参照する。タグの上に印刷されている数を使用して、どんなDNAが使用されたか、およびシグナルドットマトリックス上にどのようにDNAを分布させたかを確認することができる。適当なプローブの混合物またはひとつつのプローブを一時に使用して、本物のDNAが分布されているであろう回収されたタグ上の部位に対するこれらのプローブの特異的ハイブリダイゼーションによってタグの真偽を証明する。

実施例 3：調節DNAおよび多コピーDNAを用いたタグの製造

1. 調節DNAの製造

1.1. 微生物のDNA種を選択する。

1.2. 生体を成長させてDNAを得る。

1.3. DNAを抽出し、標準的な手法によって精製して高分子量のDNAを得る。

1.4. DNAを周密液処理して、選択したシグナルDNAの分子量に等しい平均分子量を有する分子の1個を得る。

試験することができる。この方法に従うと、所要のDNA種と特異的にハイブリダイズする配列を選択することが可能になる。別途として、このようなプローブはLaser E.E. やおよびPulser E. (1984) *Cell*, 37, 171-177の欠失富化技術のような富化技術を用いて固定することができ、こうすると労力が大幅に軽減される。

1.4. 適切なプローブを選択した後、標準的なプラスミド調製技術を用いてシグナルDNAを大量に調製し、抽出・精製して高分子量のDNAを得る。

1.5. シグナルDNAはいずれも、所要であればButler E.T. & Chamberlain H.H. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 5772が記載しているSP系列のベクターを使用することにより、一本鎖のRNA導導体に変換することができる。この導導体は一本鎖のDNAよりも迅速にDNAとハイブリダイズし、しかも制限酵素で切断することができない。

2. タグの製造

2.1. タグマトリックス上のドットの各々に対して、タグ膜上の選択された部位にそれぞれ選択した起始のシグナルDNA 5~10bp (または任意の充分量) を塗布する。DNAを変性し、これを膜たとえば Hybond N または Hybond Nに共有結合させる。

2.2. 膜を乾燥し、密封する。

2. シグナルDNAの用意

2.1. 微生物のDNA種を選択する。これらは選択DNAの起始と同じであっても同じでなくててもよい。

2.2. 簡単な手法によってゲノムDNAを調製・精製して純粋な高分子量のDNAを得る。

2.3. DNAを制限酵素(たとえば Sau3A)で消化してプローブ用の特異的配列を選択し、1%アガロースグル電気泳動によりDNAをサイズ分離し、これから、便利なサイズの断片を電気溶出し [McDonnel K.W. ら (1977) *J. Molec. Biol.*, 110, 119参照]、溶したプラスミドベクター中へクローン化することができる。これらのクローンは次に、Kafatos C. ら (1979) *Nucleic Acids Research*, 7, 1541の急速な「ドットプロット」法のようなテストを用いて他のDNA種との相容性を試験することができる。この方法に従うと、所要のDNA種と特異的にハイブリダイズする配列を選択することが可能になる。別途として、このようなプローブはLaser E.E. やおよびPulser E. (1984) *Cell*, 37, 171-177の欠失富化技術のような富化技術を用いて固定することができ、こうすると労力が大幅に軽減される。

2.4. 適切なプローブを選択した後、標準的なプラスマド酵酸技術を用いてシグナルDNAを大量に複製する。同種の連鎖DNAかまたは異種の連鎖DNAに添加するのにシグナルDNAが必要な場合、このシグナルDNAはさらに精製しなければならない。すなわち、適当な制限酵素を用いて特異的シグナル配列を切除した後、標準的な手法により残留するプローブDNAからシグナルDNAを分離する。このような精製シグナルDNAはその後均等な平均分子量の洗浄された連鎖DNAに添加できる。

2.5. シグナルDNAはいずれも、所望であればBullier E.T. & Chamberlain M.H. (1982) J. Biol. Chem., 257, 5772 が記載しているSP系列のベクターを使用することにより、一本鎖のRNA誘導体に変換することができる。この誘導体は一本鎖のDNAよりも迅速にDNAとハイブリダイズし、しかも制限酵素で切断することができない。

3. タグの製造

3.1. シグナルDNAを連鎖DNAと混合して、連鎖DNAの各単位に対して40~100 コピーの個々のシグナルDNA単位を得る。タグマトリックス上のドットの各々に対して、タグ膜上の選択された部位にDNAの複合数50~10000(または任意

の充分量)を塗布する。DNAを変性し、これを既たとえばHybond CまたはHybond Nに共有結合させる。

3.2. この膜を乾燥し、密封する。

4. タグの解説

4.1. 四種にしている物品に対して開製したタグの本質的な特徴を記載するデータバンクを参照する。タグの上に印刷されている数を使用して、どんなDNAが使用されたか、およびシグナルドットマトリックス上にどのようにDNAを分布させたかを確認することができる。その後適当なプローブの混合物またはひとつのプローブを一時に使用して、本物のDNAが塗布されているであろう回収されたタグ上の部位に対するこれらのプローブの特異的ハイブリダイゼーションによってタグの真偽を証明する。

実験例 4: 固有でコピー数の多い同一のシグナル配列を用いたタグの製造

Lactobacillus plantarum BT181 のゲノムDNAから4種のプローブを製造した。これらのプローブは pBTL8、pBTL23、pBTL29およびpBTL30であった。これらのプローブの製造はNO-A-86/02101 に記載されている。そこに記載されているようにしてこれらのプローブを標識した。これらのプローブを、迅速な

「ドットプロット」法により他の起源のDNAとの相異性について試験した。特にNO-A-86/02101 に記載されているようにして使用した高解離条件下で試験した結果または他のいすれに由来するDNAとも完全にハイブリダイズしたものはなかった。これら試験した他のDNAが Lactobacillus plantarum に由来しないDNAとハイブリダイズすることを疑う理由はない。したがって、これらの4種のプローブは所与の種に独特のものであり、これら4種はいずれも L. plantarum DNAを検出するのに使用することができるであろう。さらに解析したところ、実験にはプローブpBTL29だけが L. plantarum のDNAと頻繁にハイブリダイズすることが示された。

L. plantarum BT181のゲノムDNAを、実験例1に記載されているようにしてHybond CのタグまたはHybond Nのタグに共有結合した。実験例1に記載されているプラスチックフィルムで密封したタグを実験例1に記載されているようにして製造した。その後タグを密封しているプラスチックフィルムを除いて各タグの分析ができるようにした。

これらのプローブを使用して L. plantarum のシグナルDNAの存在を検出するために、これらのプローブを、 [³⁵S]-dCTP (テオキシシチシン5'-α [³⁵S]-チオトリホスフェ

ート) またはRenzoでラベルしたプローブ (Nucleic Acid Research, 12, 3435-3444, 1984)、すなわち酵素の西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したプローブのどちらかで標識した。

ヒートシールしたポリエチレンバッグ (Pifco Ltd.) 中、20 μg/袋の変性したニシン精子DNA (Sigma Chemical Co.) を含有するプレハイブリダイゼーションバッファー [6×SSC; 5×Denhardt's液 - 0.1% (W/V) - ficoll-400, 0.1% (W/V)ウシ血清アルブミン、0.1% (W/V) SDS] 中でタグを3時間洗浄した。新しいプレハイブリダイゼーションバッファー中65°Cでハイブリダイゼーションを実施し、標識されたDNAプローブを変性した後に最終濃度10~40ng/袋で加えた。ハイブリダイゼーション反応を含有するシールしたポリエチレンバッグを65°Cで16時間インキュベートした。ハイブリダイゼーションの後、フィルターを65°Cの 2×SSC 中で15分ずつ二回、65°Cの 2×SSC, 0.1% (W/V) SDS 中で30分かけて一回、最後に65°Cの 0.1×SSC または 1×SSC である蒸留洗浄液中で10分間洗浄した。次に、Whatman 3MM クロマトグラフィーパーパーを用いてフィルターをプロット乾燥した。

NO-A-86/02101 に記載されているようにしてオートラジオグラフィーか、または比色酵素反応 (Renzo) によって、四種の

特表昭63-503242 (10)

シグナルDNAの存在を検出した。前回の方法では、タグ上の両種シグナルDNAの位置はX線フィルム上に黒いスポットとして現われた。両種でないDNAの結合がない場合にはスポットは検出されなかった。今回に、RBG2の技術では、*L. plantarum*のシグナルDNAおよびプローブDNAのハイブリダイゼーションが存在すると、酵素反応の黒い生成物が析出した。

たタグ上の部位の電気漏出を実施した後、W0-A-86/D2101の方
針に従って解剖することによって解剖を進める。

実験例 5：より安全性の高いタグの製造

1. タグの製造

1.1. WO-A-88/02101 に記載の手順に従ってすでに特異的に同定されているDNAを有するいくつかの微生物から、高分子量の二本鎖DNAを調査する。

1.2. 250倍までの選択したDNAを、タグ膜上の広さが約250μmの定められた部位に並布し、この膜からその種類群な(fraction)DNAを層出した。

2. タグの解読 (decoding)

2.1. 図版にしている物品に対して開裂したタグの本質的な特徴を記録するデータバンクを参照する。印刷されている数を使用して、どんなシグナルDNAが使用されたかを確認することができる。本物のDNAが塗布されているであろう回収され

JAPANESE PATENT OFFICE		International Application No. PCT/GB 87/00242
I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER OF INVENTION (Classification according to the International Patent Classification System or in case of non-existence Classification and CPC according to International Patent Classification System or CPC or in case of non-existence Classification and CPC)		
IPC ^a : G 09 F 3/00; // C 12 Q 1/68		
II. PRACTICAL INFORMATION		
Invention Classification Number / Classification System		
Classification System		
IPC ^a G 09 F		
Description Received after the Patent Specification to the Inventor that such Descriptions are Included in the Patent Document		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^b Dates of Documents ^c (see below), where necessary, of the relevant documents of Descriptions Received by the Inventor		
T	US. A. 36013856 (MOLLOV) 21 January 1975 see column 3, lines 16-55; column 7, lines 5-36; column 10, lines 3-35; column 11, lines 39-50	1,2,4-6, 17-19
A	EP, A, 0133671 (MILES LABS. INC.) 6 March 1985 see pages 1-25	16
A	—	1,2,4-6, 17-19
A	US. A. 4390452 (MINNESOTA MINING & MANUFACTURING CO.) 28 June 1983 see the whole document	7-15, 20-23
A	EP, A, 0111340 (INTEGRATED GENETICS, INC.) 20 June 1984 see the whole document	1-4, 16
A	—	1,2,4-15, 17-22
A	US. A. 3733178 (ERICSSON) 16 MAY 1973 see column 1, lines 50-68; column 2, 1	1-4, 16-19
IV. STATEMENT		
One of the above Classification of the International System		
18th June 1987		Date of filing of this International Search Report 28 JULY 1987
Deposited Pursuant to Article 14(3) of the European Patent Convention		Depository of International Office M. LYNN MOL
EUROPEAN PATENT OFFICE		11/10/87

ALL DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (Mentioning from the same sheet)		
Category	Category of Document, with reference, giving abstracts, of the relevant document	Reference to claim no.
	lines 37-65; column 4-6 --	
A	US, A, 3772200 (MINNESOTA MINING & MANUFACTURING CO.) 13 November 1973 see abstract; column 6, lines 8-10 --	16
A	US, A, 4387112 (BLACH) 7 June 1983 see abstract --	1,2,4,16
A	US, A, 4113983 (SCHERFMAN et al.) 14 December 1978 see abstract --	1,2,4,16
A	Nucleic Acids Research, volume 13, no. 3, February 1985, IRL Press Limited, (Oxford, GB) A.E. FORSTER et al.: "Non-radio- active labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin", see pages 745-761 photobiotin", --	
P,A	WO, A, 86/02101 (BIOTECHNICAL LTD) 16 April 1986 cited in the application -----	

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/GB 87/00242 (SA 16773)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned International search report. The members are as contained in the European Patent Office EPO file on 04/01/87.

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 3841886	23/01/75	None	
EP-A- 0133671	06/01/83	AU-A- 3138784 JP-A- 60100056	07/02/85 03/05/85
US-A- 4390452	26/06/83	None	
EP-A- 0111340	20/06/84	JP-A- 59122492 US-A- 4421052 CA-A- 1211058	14/02/84 13/03/85 09/09/85
US-A- 3732178	15/05/73	None	
US-A- 3772200	13/11/73	US-A- 3897284	29/07/75
US-A- 4387112	07/06/83	None	
US-A- 4363965	16/12/82	None	
WO-A- 8602101	10/04/86	JP-T- 62500423 EP-A- 0227578	25/02/87 08/07/87

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.